การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกทุเรียนด้วยเครื่องหมายสก๊อต

Assessment of Genetic Relationship and Identification of Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Using SCoT Markers

ทัศนีย์ สิงห์ศิลารักษ์ และธีระชัย ธนานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Tassanee Singhsilarak and Theerachai Thanananta

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Narumol Thanananta*

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,
Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

บทคัดย่อ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนจำนวน 30 พันธุ์ ที่รวบรวมจากสวนบ้านเรา จังหวัดระยอง ด้วยเครื่องหมายสก๊อต ซึ่งข้อดีของเครื่องหมายนี้ คือ สะดวก รวดเร็ว ราคาถูก มีความหลากรูป และมีประสิทธิภาพสูง เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 80 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 19 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจน จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ปรากฏรวม 277 แถบ มีขนาดประมาณ 200-2,750 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความหลากรูป 219 แถบ คิดเป็น 79.06 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอและจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.67-0.89 สามารถแบ่งทุเรียนเป็น 2 กลุ่ม แต่ไม่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยลักษณะสัณฐานภายนอก และเมื่อวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเครื่องหมายสก๊อต แสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของทุเรียนในประเทศไทย แม้ว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงก็ตาม

คำสำคัญ : ทุเรียน; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; เครื่องหมายสก๊อต; แผนภูมิความสัมพันธ์; ค่าดัชนีความเหมือน

**Corresponding author: narumolpla@yahoo.com*

Abstract

Study on the genetic relationship of 30 durian cultivars/varieties collected from Suanbanrao durian garden in Rayong province was conducted using start codon targeted (SCoT) markers. The advantages of this marker were simple, fast, inexpensive, high polymorphism and high efficiency. Selection of primers revealed that 19 out of 80 primers were able to amplify DNA, and giving clear amplified products to construct DNA fingerprints. The total of 277 amplified bands were found ranging in sizes from approximately 200 to 2750 bp. The amount of polymorphic bands were 219 bands (79.06 %). In addition, a dendogram constructed base on polymorphic bands using UPGMA by the NTSYS-pc version 2.01e, showed similarity coefficient ranging from 0.67to 0.89. The durian samples were divided into 2 groups which was not consistent with the morphological grouping in Thailand. From this analysis, the dendogram using SCoT markers showed that although the durians had high genetic diversity, they were also closely related.

Keywords: durian; genetic relationship; start codon targeted marker; SCoT; dendogram; similarity coefficient

1. คำนำ

ทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) เป็นผลไม้เขตร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สำหรับประเทศไทย ทุเรียนได้รับการขนานนามว่าเป็นราชาผลไม้ ด้วยลักษณะภายนอกที่เป็นหนามคล้ายมงกุฎของพระราชาและเนื้อภายในมีรสชาติอร่อย แม้ว่าราคาของทุเรียนจะสูงกว่าผลไม้ชนิดอื่น แต่ก็ยังเป็นที่นิยมรับประทานกันทั่วไป ในประเทศไทยแหล่งปลูกทุเรียนที่สำคัญในเชิงการค้าจะอยู่บริเวณเขตภาคตะวันออก ภาคใต้ และภาคกลาง โดยพันธุ์ที่นิยมปลูก ได้แก่ หมอนทอง ชะนี ก้านยาว พวงมณี และกระดุมทอง (พิทักษ์, 2550)

พันธุ์ทุเรียนในประเทศไทยที่รวบรวมได้มีมากกว่า 200 พันธุ์ (ทรงพล, 2551) สาเหตุที่มีหลากหลายพันธุ์เพราะชาวสวนมักปลูกทุเรียนต้นใหม่จากเมล็ด เนื่องจากขาดแคลนกิ่งตอนหรือกิ่งทาบจากยอดพันธุ์เดิมที่หายากและมีราคาแพง ซึ่งทำให้ต้นทุเรียนใหม่ ๆ มีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากพันธุ์ดั้งเดิม และเกิดเป็นทุเรียนพันธุ์ใหม่ขึ้นมามากมาย (ฐิตาภรณ์ และคณะ, 2549) แล้วมีการตั้งชื่อทุเรียนพันธุ์ใหม่ตามลักษณะต่าง ๆ เช่น ตั้งตามเจ้าของต้น ตัวอย่าง เช่น พันธุ์หลงลับแล ตั้งโดยเจ้าของต้นทุเรียนชื่อหลง อยู่ในอำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์

การปลูกทุเรียนด้วยเมล็ดทำให้ทุเรียนมีความหลายหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง มีการจัดกลุ่มทุเรียนในประเทศไทยเป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มกบ กลุ่มลวง กลุ่มก้านยาว กลุ่มกำปั่น กลุ่มทองย้อย และกลุ่มเบ็ดเตล็ด (หิรัญ และคณะ, 2542) โดยจำแนกจากลักษณะสัณฐาน (morphology) ของทรงใบ บริเวณปลายใบ ฐานใบ ทรงผล และหนามผล ซึ่งเป็นลักษณะค่อนข้างคงที่ (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544)

การศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) โดยเปรียบเทียบจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิต จะช่วยในการจำแนกและบ่งบอกความ

แตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบได้ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบ่งตามเทคนิคการทำเป็น 2 ประเภท คือ (1) เครื่องหมายที่ใช้การไฮบริไดซ์ (hybridization-based marker) เช่น อาร์เอฟแอลพี (RFLP, restriction fragment length polymorphism) (Tanksley *et al*., 1989) และ (2) เครื่องหมายที่ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR-based marker) เช่น อาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) (Zebrowska *et al*., 2003) สก๊อต (SCoT, start codon targeted) (Satya *et al*., 2015) เอสเอสอาร์ (SSR, simple sequence repeat) (Eric and John, 2005) (สุรีพร, 2546)

เครื่องหมายสก๊อตใช้ไพรเมอร์ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งออกแบบให้มีรหัสพันธุกรรม (genetic code) เริ่มต้นในการแปลรหัส (translation) หรือ ATG อยู่ด้วย โดยอุณหภูมิสำหรับให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) หรือ annealing temperature (T_a) คือ 50 องศาเซลเซียส (Collard and Mackill, 2009) มีรายงานการวิจัยที่ใช้เครื่องหมายสก๊อตในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพืช เช่น มะม่วง (Lou *et al*., 2010) องุ่น (Guo *et al*., 2012) บอระเพ็ด (Paliwal *et al*., 2013) มะเขือเทศ (Admad *et al*., 2014) พืชสกุลมะพลับ (Deng *et al*., 2015) ฯลฯ ข้อดีของเครื่องหมายสก๊อต คือ เป็นเครื่องหมายที่สามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก ให้ความหลากรูป (polymorphism) และมีประสิทธิภาพ

เนื่องจากทุเรียนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและยังไม่มีการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายสก๊อต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนด้วยเครื่องหมายสก๊อต โดยใช้ตัวอย่างพันธุ์ทุเรียนจากสวนบ้านเรา จังหวัดระยอง เพื่อให้ทราบถึงความใกล้ชิดระหว่างพันธุ์ทุเรียนจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างทุเรียน

พันธุ์ทุเรียนที่ใช้ในงานวิจัย 30 พันธุ์ ได้แก่ (1) กบวัดกล้วย (2) กบเจ้าคุณ (3) ห้าลูกไม่ถึงผัว (4) ลวงทอง (5) นกหยิบ (6) กำปั่นเหลือง (7) กำปั่นเดิม (8) ทองแดง (9) ทองย้อยฉัตร (10) พวงมณี (11) หลงลับแล (12) ทองสุก (13) ต้นใหญ่ (14) ก้านยาว (15) ชะนี (16) ชะนีน้ำตาลทราย (17) หลินลับแล (18) ฉัตรสีทอง (19) ชมพูพาน (20) กะเทยเนื้อขาว (21) ชมพูศรี (22) กำปั่นพวง (23) ธรณีไหว (24) อีลีบนายทิพย์ (25) กบพิกุล (26) ทับทิม (27) กบรัศมี (28) เม็ดในก้านยาว (29) ก้านสั้น และ (30) กบสุวรรณ โดยเก็บตัวอย่างใบทุเรียนจากสวนบ้านเรา ซึ่งเป็นสวนทุเรียนในตำบลกระแสบน อำเภอแกลง จังหวัดระยอง

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากใบทุเรียนด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) โดยใช้ใบทุเรียนประมาณ 3 กรัม และสกัดตามวิธีของวริสรา และคณะ (2557)

2.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง โดยสารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วน OD_{260}/OD_{280} ประมาณ 1.7-1.8 หลังจากนั้นจึงทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) และถ่ายภาพเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป (Sambrook *et al*., 1989)

2.4 การคัดเลือกไพรเมอร์

คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน โดยเจือจางดีเอ็นเอทุเรียน 30 พันธุ์ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำดีเอ็นเอทุเรียนแต่ละพันธุ์ผสมลงในหลอดเดียวกันเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ด้วยไพรเมอร์ 80 ชนิด โดยไพรเมอร์ 1-45 อ้างอิงจากงานวิจัยของ Wu และคณะ (2013) และไพรเมอร์ 47-80 อ้างอิงจากงานวิจัยของ Luo และคณะ (2010)

2.5 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

คัดเลือกไพรเมอร์สก๊อตที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน นำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในทุเรียน 30 พันธุ์ ซึ่งมีขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังตารางที่ 1 จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบภายใต้แสงอัตราไวโอเลต โดยเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอที่ทราบขนาด (DNA ladder) ซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard)

2.6 การวิเคราะห์ผล

ตรวจสอบความสัมพันธ์ของทุเรียน 30 พันธุ์ ด้วยการเปรียบเทียบความเหมือน และความต่างของแถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้สัญลักษณ์เป็น 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้สัญลักษณ์เป็น 0 แล้วคำนวณดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e เลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

ตารางที่ 1 อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

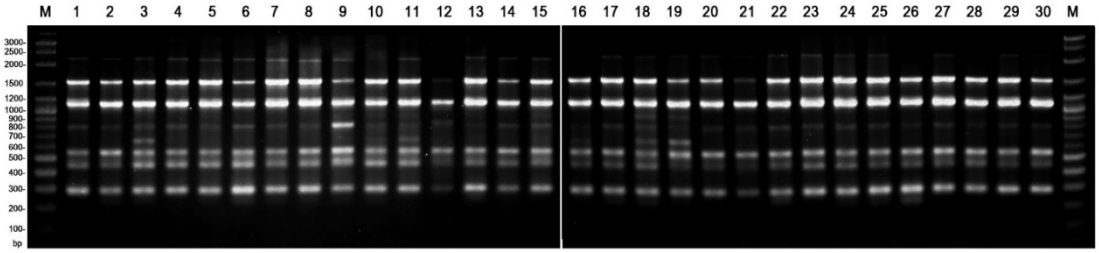
ขั้นตอน	อุณหภูมิ (° C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3.00	1
Denaturation	94	0.30	40
Annealing	46	0.40	
Extension	72	1.00	
Final extension	72	5.00	1

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับเทคนิคสก๊อตจากไพรเมอร์ 80 ชนิด พบไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทุเรียน 46 ชนิด คิดเป็น 57.5 เปอร์เซ็นต์ และคัดเลือกไพรเมอร์ที่เพิ่มดีเอ็นเอได้ในปริมาณสูงและให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน รวม 19 ชนิด ได้แก่ SCoT22, SCoT23, SCoT31, SCoT35, SCoT46, SCoT47, SCoT48, SCoT52, SCoT53, SCoT54, SCoT66, SCoT67, SCoT68, SCoT71, SCoT72 SCoT73, SCoT74, SCoT76 และ SCoT77 และเมื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุเรียน 30 พันธุ์ จากไพรเมอร์ 19 ชนิด พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 277 แถบ มีขนาดประมาณ 200-2,750 คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความหลากรูป 219 แถบ คิดเป็น 79.06 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ SCoT68 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 32 แถบ และไพรเมอร์ SCoT23, SCoT46 และ SCoT47 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 9 แถบ ซึ่งตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ SCoT71 แสดงดังรูปที่ 1

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียน 30 พันธุ์ โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e และเลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.67-0.89 (รูปที่ 2) และได้แผนภูมิความสัมพันธ์ดังรูปที่ 3 เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือน

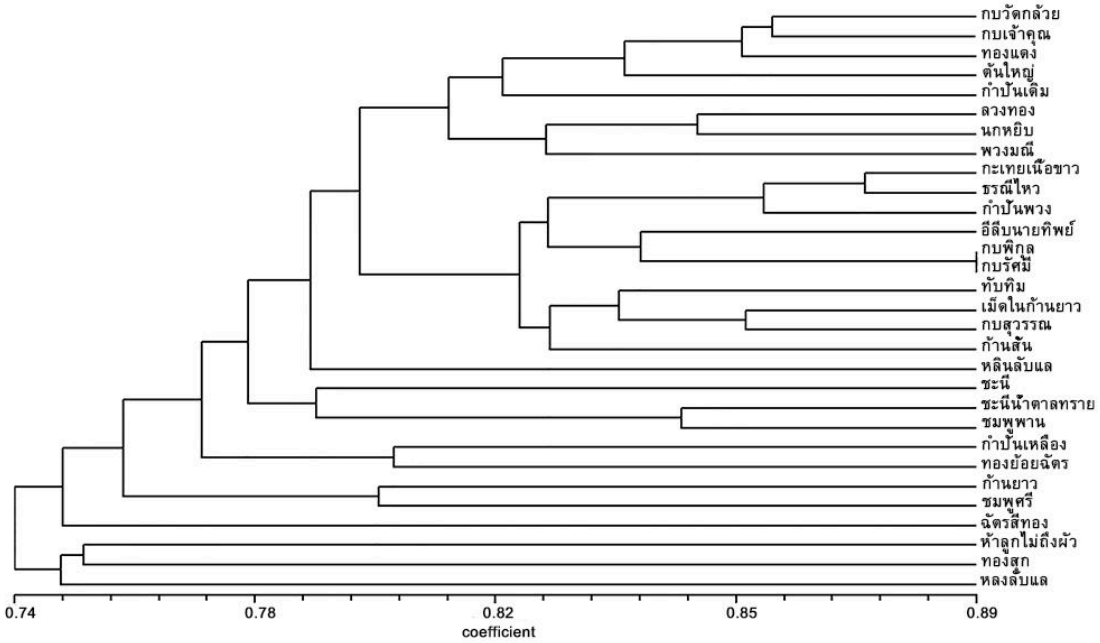
ที่ 0.745 สามารถแยกทุเรียนออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มใหญ่ ได้แก่ กบวัดกล้วย กบเจ้าคุณ ทองแดง ต้นใหญ่ กำปั่นเดิม ลวงทอง นกหยิบ พวงมณี กะเทยเนื้อขาว ธรณีไหว กำปั่นพวง อีลีบนายทิพย์ กบพิกุล กบรัศมี ทับทิม เม็ดในก้านยาว กบสุวรรณก้านสั้น หลินลับแล ชะนี ชะนีน้ำตาลทราย



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคสก๊อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT71 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™), หมายเลข 1-30 คือ (1) กบวัดกล้วย (2) กบเจ้าคุณ (3) ห้าลูกไม่ถึงผัว (4) ลวงทอง (5) นกหยิบ (6) กำปั่นเหลือง (7) กำปั่นเดิม (8) ทองแดง (9) ทองย้อยฉัตร (10) พวงมณี (11) หลงลับแล (12) ทองสุก (13) ต้นใหญ่ (14) ก้านยาว (15) ชะนี (16) ชะนีน้ำตาลทราย (17) หลินลับแล (18) ฉัตรสีทอง (19) ชมพูพาน (20) กะเทยเนื้อขาว (21) ชมพูศรี (22) กำปั่นพวง (23) ธรณีไหว (24) อีลีบนายทิพย์ (25) กบพิกุล (26) ทับทิม (27) กบรัศมี (28) เม็ดในก้านยาว (29) ก้านสั้น และ (30) กบสุวรรณ]

	กบวัดกล้วย	กบเจ้าคุณ	ห้าลูกไม่ถึงผัว	ลวงทอง	นกหยิบ	กำปั่นเหลือง	กำปั่นเดิม	ทองแดง	ทองย้อยฉัตร	พวงมณี	หลงลับแล	ทองสุก	ต้นใหญ่	ก้านยาว	ชะนี	ชะนีน้ำตาลทราย	หลินลับแล	ฉัตรสีทอง	ชมพูพาน	กะเทยเนื้อขาว	ชมพูศรี	กำปั่นพวง	ธรณีไหว	อีลีบนายทิพย์	กบพิกุล	ทับทิม	กบรัศมี	เม็ดในก้านยาว	ก้านสั้น	กบสุวรรณ
กบวัดกล้วย	1.00																													
กบเจ้าคุณ	0.86	1.00																												
ห้าลูกไม่ถึงผัว	0.77	0.74	1.00																											
ลวงทอง	0.85	0.84	0.76	1.00																										
นกหยิบ	0.84	0.77	0.75	0.85	1.00																									
กำปั่นเหลือง	0.79	0.78	0.71	0.75	0.75	1.00																								
กำปั่นเดิม	0.81	0.79	0.74	0.79	0.78	0.81	1.00																							
ทองแดง	0.86	0.85	0.75	0.84	0.83	0.80	0.85	1.00																						
ทองย้อยฉัตร	0.82	0.76	0.71	0.78	0.79	0.80	0.77	0.80	1.00																					
พวงมณี	0.81	0.79	0.74	0.82	0.82	0.77	0.78	0.81	0.79	1.00																				
หลงลับแล	0.76	0.74	0.75	0.70	0.73	0.74	0.74	0.74	0.74	0.73	1.00																			
ทองสุก	0.77	0.74	0.75	0.79	0.78	0.68	0.74	0.79	0.73	0.74	0.74	1.00																		
ต้นใหญ่	0.85	0.81	0.76	0.80	0.80	0.77	0.81	0.85	0.80	0.81	0.74	0.74	1.00																	
ก้านยาว	0.74	0.74	0.73	0.73	0.68	0.72	0.76	0.73	0.72	0.71	0.73	0.71	0.78	1.00																
ชะนี	0.80	0.77	0.72	0.81	0.79	0.72	0.76	0.79	0.76	0.75	0.76	0.76	0.82	0.71	1.00															
ชะนีน้ำตาลทราย	0.78	0.76	0.76	0.78	0.77	0.73	0.72	0.79	0.76	0.77	0.73	0.76	0.77	0.74	0.78	1.00														
หลินลับแล	0.78	0.77	0.70	0.80	0.80	0.72	0.80	0.80	0.73	0.77	0.74	0.72	0.77	0.73	0.77	0.76	1.00													
ฉัตรสีทอง	0.74	0.71	0.68	0.74	0.77	0.72	0.73	0.77	0.78	0.76	0.72	0.73	0.74	0.67	0.76	0.75	0.74	1.00												
ชมพูพาน	0.79	0.78	0.78	0.75	0.73	0.73	0.74	0.76	0.77	0.76	0.77	0.74	0.81	0.77	0.79	0.85	0.75	0.75	1.00											
กะเทยเนื้อขาว	0.83	0.81	0.75	0.80	0.77	0.78	0.82	0.84	0.78	0.78	0.75	0.73	0.84	0.78	0.79	0.79	0.80	0.76	0.84	1.00										
ชมพูศรี	0.82	0.75	0.76	0.75	0.74	0.77	0.77	0.78	0.73	0.75	0.73	0.71	0.80	0.80	0.76	0.76	0.74	0.70	0.78	0.81	1.00									
กำปั่นพวง	0.81	0.80	0.74	0.77	0.74	0.80	0.83	0.80	0.77	0.76	0.72	0.70	0.81	0.79	0.74	0.76	0.82	0.72	0.80	0.86	0.82	1.00								
ธรณีไหว	0.81	0.78	0.77	0.82	0.77	0.77	0.80	0.81	0.79	0.79	0.71	0.74	0.80	0.74	0.76	0.80	0.79	0.76	0.82	0.88	0.79	0.86	1.00							
อีลีบนายทิพย์	0.83	0.79	0.74	0.82	0.83	0.76	0.75	0.82	0.81	0.80	0.73	0.74	0.80	0.72	0.80	0.81	0.81	0.77	0.75	0.82	0.79	0.80	0.85	1.00						
กบพิกุล	0.83	0.80	0.74	0.82	0.80	0.76	0.79	0.83	0.77	0.79	0.72	0.76	0.81	0.72	0.78	0.80	0.80	0.77	0.76	0.87	0.79	0.80	0.82	0.86	1.00					
ทับทิม	0.78	0.79	0.73	0.78	0.77	0.75	0.76	0.79	0.78	0.79	0.72	0.73	0.77	0.74	0.75	0.80	0.76	0.77	0.74	0.80	0.76	0.79	0.78	0.80	0.83	1.00				
กบรัศมี	0.84	0.80	0.75	0.80	0.78	0.74	0.80	0.81	0.75	0.75	0.75	0.73	0.81	0.74	0.76	0.77	0.78	0.73	0.76	0.85	0.79	0.82	0.80	0.82	0.89	0.80	1.00			
เม็ดในก้านยาว	0.78	0.77	0.74	0.80	0.74	0.76	0.76	0.79	0.76	0.77	0.69	0.73	0.77	0.70	0.76	0.80	0.75	0.76	0.77	0.83	0.76	0.81	0.84	0.81	0.84	0.84	0.81	1.00		
ก้านสั้น	0.79	0.80	0.70	0.81	0.75	0.74	0.77	0.79	0.73	0.76	0.70	0.73	0.79	0.75	0.76	0.75	0.74	0.72	0.74	0.81	0.78	0.82	0.80	0.80	0.83	0.81	0.83	0.82	1.00	
กบสุวรรณ	0.82	0.79	0.76	0.80	0.77	0.73	0.79	0.79	0.77	0.74	0.74	0.72	0.77	0.75	0.78	0.80	0.79	0.77	0.80	0.84	0.79	0.84	0.83	0.82	0.84	0.83	0.84	0.86	0.84	1.00

รูปที่ 2 ค่าดัชนีความเหมือนของทุเรียน 30 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคสก๊อต



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของทุเรียน 30 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคสก๊อต

ชมพูพาน กำปั่นเหลือง ทองย้อยฉัตร ก้านยาว ชมพูศรี และฉัตรสีทอง ส่วนกลุ่มที่ 2 มีสมาชิก 3 พันธุ์ คือ ทองสุก หลงลับแล และห้าลูกไม่ถึงผัว สำหรับพันธุ์ทุเรียนที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด คือ กบพิกุลกับกบรัศมี มีค่าดัชนีความเหมือน 0.89 ส่วนพันธุ์ทุเรียนที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด คือ ฉัตรสีทองกับก้านยาว มีค่าดัชนีความเหมือน 0.67

ผลการจัดกลุ่มของทุเรียนที่ได้จากแผนภูมิความสัมพันธ์นั้น จะเห็นว่าแบ่งกลุ่มทุเรียนเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่ม 1 เป็นกลุ่มใหญ่ที่มีกลุ่มย่อย ๆ ภายใน แต่บางพันธุ์ไม่มีการจัดกลุ่ม เช่น พันธุ์หลินลับแล ซึ่งเป็นพันธุ์ทุเรียนที่มีความสำคัญของจังหวัดอุตรดิตถ์ มีลักษณะพิเศษ คือ เปลือกผลบาง เนื้อละเอียดมาก แห้ง มีสีเหลืองอ่อน กลิ่นอ่อน รสชาติหวานมัน เมล็ดเล็กและลีบ (มนัส, 2545; พิชัย, 2556; พิชัย, 2558) เป็นทุเรียนพันธุ์กลายที่มีลักษณะแปลกกว่าทุเรียนพันธุ์อื่น ส่วนทุเรียนในกลุ่มย่อยของกลุ่ม 1 ได้แก่ ชะนี ชะนีน้ำตาลทราย และชมพูพาน จัดว่ามีความใกล้ชิดกัน ถ้าพิจารณาการจัดกลุ่มทุเรียนในประเทศไทยของสำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ ถือว่าอยู่ในกลุ่มลวง ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะใบ รูปทรงผล และลักษณะหนาม กล่าวคือ หากมีลักษณะสัณฐานเหมือนกันจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่ก็พบว่าทุเรียนบางพันธุ์มีลักษณะสัณฐานต่างกัน แต่ในแผนภูมิความสัมพันธ์แสดงความใกล้เคียงกัน เช่น ก้านยาวกับชมพูศรี มีค่าดัชนีความเหมือน 0.80 โดยก้านยาวอยู่ในกลุ่มก้านยาว และชมพูศรีอยู่ในกลุ่มลวง ซึ่งแสดงว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้ไม่สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานทั้งหมด

กลุ่ม 2 มีสมาชิก 3 พันธุ์ คือ ทองสุก หลงลับแล และห้าลูกไม่ถึงผัว มีลักษณะสัณฐานต่างจากกลุ่มแรก เมื่อพิจารณาแต่ละพันธุ์ พบว่าพันธุ์ทองสุกเป็นทุเรียนพันธุ์ดีที่เหมาะสำหรับเพาะปลูก แต่เกษตรกรหากิ่งพันธุ์ไม่ได้ จึงใช้การปลูกจากเมล็ดแทน ทำให้

เกิดทุเรียนพันธุ์กลายขึ้นมากมาย (หิรัญ และคณะ, 2531) ซึ่งในความเป็นจริงพันธุ์ทุเรียนแตกต่างกันที่เกิดขึ้น ไม่ได้เกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) แต่เกิดจากการผสมข้ามเกสร (cross pollination) เมล็ดจึงมีการกระจายตัวต่างจากพันธุ์พ่อแม่ และยังแสดงให้เห็นว่าพันธุ์ทุเรียนที่ปลูกกันทั่วไปส่วนใหญ่ไม่ใช่พันธุ์แท้ โดยนิยมปลูกจากเมล็ด เพราะจะทำให้ได้ลักษณะที่ไม่เหมือนต้นเดิม ส่วนพันธุ์หลงลับแลเป็นพันธุ์ทุเรียนที่มีรสชาติโดดเด่นและมีเอกลักษณ์เฉพาะตัว เป็นพันธุ์เฉพาะถิ่นที่สร้างชื่อเสียงให้กับจังหวัดอุตรดิตถ์ และพันธุ์ห้าลูกไม่ถึงผัว จัดเป็นทุเรียนพันธุ์เล็ก และมีรสชาติอร่อย ซึ่งจากเหตุผลที่กล่าวข้างต้นจึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ทุเรียนในกลุ่ม 2 มีลักษณะแตกต่างจากกลุ่ม 1

อย่างไรก็ตาม การจัดกลุ่มทุเรียน 30 พันธุ์ด้วยเครื่องหมายสก๊อต เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับงานวิจัยเรื่องการจำแนกทุเรียนจากการรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี จำนวน 130 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคเอเอฟเอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism DNA) ซึ่งจัดทุเรียนได้ 2 กลุ่ม โดยกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 เป็นกลุ่มใหญ่ที่แบ่งได้หลายกลุ่มย่อย และบางพันธุ์ไม่มีการจับกลุ่ม แสดงว่าทุเรียนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง แต่ก็ยังมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม และได้ให้เหตุผลว่าชาวสวนมักจะนำเมล็ดทุเรียนมาปลูกใหม่ เนื่องจากกิ่งพันธุ์ดีหายาก การปลูกทุเรียนจากเมล็ดทำให้เกิดลักษณะใหม่ ๆ ของทุเรียนและมีการตั้งชื่อเป็นพันธุ์ใหม่ขึ้นมา (ฐิตาภรณ์ และคณะ, 2549) ดังนั้นในประเทศไทยจึงพบพันธุ์ทุเรียนมากกว่า 200 พันธุ์

นอกจากนี้พบว่ามีงานวิจัยทุเรียนด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเออื่น เช่น วิเคราะห์พันธุกรรมของทุเรียนพื้นบ้านในภาคใต้โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) 67 ต้น โดยใช้โปรแกรม NTSYS และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มทุเรียนพื้นบ้านภาคใต้เป็น 6 กลุ่ม มีค่าดัชนีความเหมือน 0.52-0.95 และแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้แยกแต่ละกลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของตัวอย่าง กล่าวคือ ทุเรียนที่มาจากพื้นที่เดียวกันจะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่ก็มีบางตัวอย่างที่กระจายตัวออกไป โดยจัดไปรวมอยู่ในกลุ่มพื้นที่อื่น (ฮูดา และคณะ, 2557) การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์ทุเรียนพื้นเมืองในจังหวัดนนทบุรีด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (SSR, simple sequence repeat) 47 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ 20 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 16 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 142-274 คู่เบส และผลการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถจำแนกพันธุ์ทุเรียนเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ แต่ไม่สอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานที่เคยรายงานมาก่อน (เอมอร และคณะ, 2556)

งานวิจัยที่เคยมีรายงานมาก่อนนั้น มีการใช้เครื่องหมายสก๊อตในพืชชนิดหรือสปีชีส์ (species) เดียวกัน ได้แก่ การศึกษาความสัมพันธ์ในกล้วย 25 พันธุ์ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ 15 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างชัดเจน เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.427-0.854 และแบ่งกล้วยได้ 2 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับจีโนมของกล้วย โดยกลุ่ม 1 เป็นจีโนม AAB, ABB, BBB และ ABBB มีลักษณะ คือ มีจีโนม B อยู่ด้วย ส่วนกลุ่ม 2 เป็นจีโนม AA และ AAA ลักษณะคือ มีเฉพาะจีโนม A (พรประภา และคณะ, 2560) การศึกษาความสัมพันธ์ในข้าวพันธุ์ปลูก 24 พันธุ์ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ 22 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างชัดเจน เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.60-0.91 และแบ่งข้าวพันธุ์ปลูกได้ 3 กลุ่ม โดยข้าวพันธุ์ปลูกที่เกิดจากการผสมกันของพ่อแม่เดียวกันจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนข้าวพันธุ์ปลูกที่เกิดจากการผสมกันของพ่อแม่ต่างกันจะจัดอยู่กันคนละกลุ่ม (ทัศนีย์ และ

คณะ, 2560)

งานวิจัยที่ศึกษาในต่างชนิดหรือสปีชีส์ด้วยเครื่องหมายสก๊อต เช่น การศึกษาในกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ เช่น กล้วยไม้สกุลก้านก่อ (*Eria*) (นฤมล และคณะ, 2560) กล้วยไม้รองเท้านารี สกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ Brachypetalum (ธีระชัย และคณะ, 2560) กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบเขียว สกุล *Paphiopedilum* (ธีระชัย และคณะ, 2560) ฯลฯ

4. สรุป

งานวิจัยนี้ คัดเลือกไพรเมอร์ได้ 9 จาก 80 ชนิด ที่สามารถเพิ่มดีเอ็นเอในปริมาณสูงและให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน เพื่อประเมินความสัมพันธ์ของทุเรียน 30 พันธุ์ เมื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบแถบดีเอ็นเอรวม 277 แถบ มีขนาดประมาณ 200-2,750 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความหลากรูปจำนวน 219 แถบ คิดเป็น 79.06 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ SCoT68 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด (32 แถบ) และไพรเมอร์ SCoT23, SCoT46 และ SCoT47 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด (9 แถบ) เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e และจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.67-0.89 เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.745 สามารถแบ่งทุเรียนเป็น 2 กลุ่ม กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มใหญ่ที่มีกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม และบางพันธุ์ไม่จัดเป็นกลุ่ม และกลุ่ม 2 ประกอบด้วย ทองสุก หลงลับแล และห้าลูกไม่ถึงผัว แสดงให้เห็นว่าทุเรียนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แต่ก็มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยเช่นกัน สำหรับพันธุ์ทุเรียนที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด คือ กบพิกุลกับกบรัศมี มีค่าดัชนีความเหมือน 0.89 ส่วนพันธุ์ทุเรียนที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด คือ ฉัตรสีทองกับก้านยาว มีค่าดัชนีความเหมือน 0.67

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณขจร พฤฒิสุขนิรันดร์ เจ้าของสวนทุเรียน “สวนบ้านเรา” ตำบลกระแสบน อำเภอแกลง จังหวัดระยอง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างใบทุเรียนสำหรับงานวิจัยนี้

6. รายการอ้างอิง

ฐิตาภรณ์ สุขโหตุ, อินทิรา จารุเพ็ง, ประไพ โมจรินทร์, อภิรดี เพิ่มผล, อรุณนี สระเก้า, ศิริวรรณ เทียนมงคล, ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ และพรชัย จุฑามาศ, 2549, การจัดจำแนกทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) โดยใช้เทคนิค AFLP, น. 405-410, การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย : สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว, ศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ, นครราชสีมา.

ทรงพล สมศรี, 2551, ทุเรียนไทยและการปรับปรุงพันธุ์ : กรณีศึกษาพันธุ์จันทบุรี 1 จันทบุรี 2 จันทบุรี 3, สำนักพิมพ์กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ทัศนีย์ สิงห์ศิลารักษ์, จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการจำแนกข้าวปลูกบางพันธุ์ด้วยเครื่องหมายสก๊อต, Thai J. Sci. Technol. 6(3): 253-261.

ธีระชัย ธนานันต์ ทีปกา มีเสงี่ยม และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ Brachypetalum ด้วยเครื่องหมายสก๊อต, Thai J. Sci. Technol. 6(3): 161-170.

ธีระชัย ธนานันต์, พรประภา ศิริเทพทวี, ภัทรพร คุ้มภัย และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการ

ระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบเขียวด้วยเครื่องหมายสก๊อต, Thai J. Sci. Technol. 6(3): 171-178.

นฤมล ธนานันต์, จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์ และธีระชัย ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก่อด้วยเครื่องหมายสก๊อต, Thai J. Sci. Technol. 6(3): 153-160.

พรประภา ศิริเทพทวี, ฐิตาพร มณีเนตร, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยด้วยเครื่องหมายสก๊อต, Thai J. Sci. Technol. 6(3): 272-278.

พิชัย ใจกล้า, 2556, สัณฐานวิทยาและสัณฐานวิทยาเรณูของทุเรียนพันธุ์หลงลับแล, ว.เกษตร 29(3): 187-194.

พิชัย ใจกล้า, 2558, การติดผลและลักษณะของทุเรียนที่เกิดจากการผสมเกสรในจังหวัดอุตรดิตถ์, ว.เกษตรพระจอมเกล้า 33(2): 29-37.

พิทักษ์ ใจคง, 2550, ปฏิบัติการพืชเศรษฐกิจ (Economic Botany Laboratory) : พืชผลไม้, มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ. 437 น.

มนัส ดาเกลี้ยง, 2545, เอกสารทางวิชาการ เรื่องพันธุ์ทุเรียนเมืองลับแล, สถาบันราชภัฏอุตรดิตถ์, อุตรดิตถ์, 17 น.

วริสรา แทนสง่า, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3(2): 102-112.

สุรีพร เกตุงาม, 2546, เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช, ว.วิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5(2): 37-59.

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544, ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์ทุเรียน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เอมอร รุ่งแจ้งสุวรรณ, ปิยรัษฎ์ เจริญทรัพย์, วิษุวัต สงนวล, อุษณีษ์ พิชกรรม และศศิวิมล แสวงผล, 2556, การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์ทุเรียน (*Durio zibethinus* L.) ในจังหวัดนนทบุรีโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์, น. 45, การประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 7, มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

ฮูดา แก้วศรีสม, กรกช นาคคนอง, และจรัสศรี นวลศรี, 2557, การวิเคราะห์พันธุกรรมของทุเรียนพื้นบ้านในภาคใต้โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์, ว.แก่นเกษตร 42(พิเศษ 3): 271-276.

Ahmad, S., Sepideh, T. and Mahmood, K., 2014, Efficiency of SCoT and ISSR markers in assessment of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) genetic diversity, Int. J. Bio. Sci. 5: 14-22.

Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J., 2009, Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants, Plant Mol. Biol. 27: 86-93.

Deng, L.B., Liang, Q.Z., He, X.H., Lou, C., Chen, H. and Qin, Z.S., 2015, Investigation and analysis of genetic diversity of diospyros germplasms using SCoT molecular markers in Guangxi, PLoS ONE 10(8): e0136510.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-15.

Eric T.S. and John R.C., 2005, Simple sequence repeat (SSR) markers for genetic mapping of raspberry and blackberry, J. Am. Soc. Hortic. Sci. 130: 1-7.

Guo, D.L., Zhang, J.Y. and Liu, C.H., 2012, Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses, Mol. Biol. 39: 5307-5313.

Luo, C., He, X.H., Chen, H., Ou S.J. and Gao M.P., 2010, Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using start codon targeted (SCoT) markers. Biochem Syst. Ecol. 38: 1176-1184.

Paliwal, R., Singh, R., Singh, A.M., Kumar, S., Kumar, A. and Singh, R.M., 2013, Molecular characterization of Giloe (*Tinospora cordifolia* (Willd. Miers ex Hook. F. and Thoms.) accessions using start codon targeted (SCoT) markers, Int. J. Med. Arom. Plants 3: 413-422.

Rohlf, F.J., 2002, NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics, Inc., New York.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Satya, P., Karan, M., Jana, S., Mitra, A., Sharma, A., Karmakar, P.G. and Ray, D.P., 2015, Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.), a premium textile fiber producing species, Meta Gene 3: 62-70.

Tankslay, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H. and Bonierbale, M.W., 1989, RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science, Biotechnology 7: 257-264.

Wu, J. M., Li, Y.R., Yang, L.T., Fang, F.X., Song H.Z., Tang, H.Q., Wang, M. and Weng, M.L., 2013, cDNA-SCoT: A novel rapid method for analysis of gene differential expression in sugarcane and other plants, Aust. J. Crop Sci. 7: 659-664.

Zebrowska, J.I. and Tyrka, M., 2003, The use of RAPD markers for strawberry identification and genetic diversity studies, J. Food Agric. Environ. 1: 115-117.